研究用試薬　　2010 年 10 月 1 日改訂

『 イムノキャット® インスリンキット 』

（CodeNo.:AKRIN-015）

この添付文書をよく読んでから使用して下さい。

目　　次

１．使用目的	1
２．キットの保存と使用期限	1
３．イントロダクション	1
４．測定原理	2
５．注意事項	2
６．技術上のヒント	2
７．構成品	2
８．添付されていないが必要な器具	3
９．試薬の調製	3
１０．検体の調製	4
１１．測定操作法	5
１２．計算	5
１３．キットの性能	6
１４．トラブルシューティングと Q&A	6
１５．参考文献	6
測定操作概要	7
ワークシート	8

キットに同梱された最新版の取扱説明書のみに従って測定を実施して下さい。

１．使用目的

イムノキャット® インスリンキットはネコインスリンを定量的に測定するためのサンドイッチ酵素免疫測定法です。このキットは研究のみにご使用下さい。

特長

●全反応時間は 3 時間です。
●血清または血漿（ヘパリン血漿を推奨します）中のインスリンを測定します。
●微量な検体（標準操作法は 10µl）で測定可能です。
●1 キットは 96 ウエルです。
●標準品はネコ由来のものです。
●全ての試薬は溶液タイプです。

２．キットの保存と使用期限

キットは 2～8℃で保存して下さい。この保存条件下でキットは使用期限（外箱のラベルに記載）までは安定です。開封した各試薬につきましては､保管の状態により､影響を受ける可能性がありますので早めのご使用を推奨します。

３．イントロダクション

インスリンは膵臓のランゲルハンス島（膵島）のβ細胞から分泌されるホルモンで、分子量は約 5,800、等電点 5.4 付近の蛋白質です。

A6-A11、A7-B7、A20-B-19 で S-S 結合を形成し、酸性或いは Zn の存在しない中性水溶液では 2 量体を形成しますが、中性で Zn 存在下では Zn2 個を含む 6 量体を形成します。

肝、筋肉、脂肪組織が主要な標的組織ですが、それぞれに次のような作用を示します。

肝：グリコーゲン合成促進、蛋白合成促進、脂肪酸合成促進、糖利用の促進、糖新生抑制。
筋肉：糖、アミノ酸、K の細胞膜透過性増大、グリコーゲン合成促進、蛋白合成促進、蛋白分解抑制。
脂肪組織：グルコースの細胞膜透過性増大、脂肪酸合成促進。

インスリンは細胞内で 1 本鎖のプロインスリンの形で合成された後、S-S 結合が形成され、酵素分解による活性化がおこって C-ペプチドとインスリンが分離します。

Insulin の WHO 第 4 次国際標準品（1958）は Bovine Insulin 52%と Porcine Insulin 48%の混合物で、力価は、

24IU/mg（0.04167mg/IU）と定められていました。その後インスリンの精製度が進み、WHO はヒトインスリンの 1st International Standard、 1986 として 26IU/mg（0.038mg/IU）の精製品を提供しております。同時にウシインスリンについて 1st International Standard、1986、25.7IU/mg、ブタインスリン 1st International Standard、1986、26IU/mg を提供するようになりました。それ以前にヒトインスリンのイムノアッセイ用標準品 1st International Reference Preparation、1974 があります。これは 1 アンプルあたり 3IU とされております。ヒトの場合、治療用に用いられますから、それに合わせてヒトの臨床検査での測定値も IU で表現する方が便利なのでしょうが、動物では重量で扱った方が良いでしょう。
上記のように精製インスリンは 26IU/mg と考えても良いでしょう。
ネコの血液中には、抗インスリン自己抗体が存在しているので免疫学的測定系を妨害する可能性があります(1)。

４．測定原理

本キットはネコ血液中に存在するインスリン自己抗体を前処理により除去し検体とします。ビオチン結合抗インスリン抗体、標準品、検体を抗インスリンモノクローン抗体固相化マイクロプレートウエル中でインキュベートします。2 時間インキュベーションし洗浄後、ペルオキシダーゼ・アビジン結合物を加え、捕捉されたインスリンとともに 30 分インキュベートします。再度の洗浄後、ウエルに残ったペルオキシダーゼを発色液（TMB）と反応させます。反応は酸性の溶液の添加で停止され、反応の結果生じた黄色の産物が 450nm（副波長 620nm）で比色測定されます。吸光度はインスリン濃度にほぼ比例します。標準品濃度に対して吸光度をプロットすることで標準曲線が作られ、この標準曲線を使って未知検体中の濃度が決定されます(2)。

５．注意事項

●本キットは ELISA 法の研修を終了した方、または指導者の下でご使用下さい。
用手法操作で測定する際にはピペッティング操作の再現性が安定した方がご使用下さい。
●準備並びに本キット操作中は手袋、眼鏡、保護用着衣を身につけて下さい。
●試薬類を皮膚に付けないで下さい。本キットの試薬が誤って、目、口、傷口、皮膚等に付着した場合は直ちに水道水で充分に洗い流す等の応急処置を行い、必要な場合は医師の手当てを受けて下さい。
●本キットを使用している場所では飲食や喫煙をしないで下さい。
●本キットは動物由来の成分を含んでいます。検体は感染の危険性があるものとして充分注意して取り扱って下さい。
●試薬類は口でピペッティングしないで下さい。
●ロット番号の違うものとは混ぜて使わないで下さい。
●各ステップでの静置反応時には、ウエルの乾燥、異物の混入、分注試薬の蒸発を防止する為、必ずプレートカバーを被せて下さい。
●ELISA 法は測定環境により影響を受けます。測定操作、静置反応場所の室温：20～25℃（実験台上またはインキュベータ内温度）を厳守して下さい。また、風速（エアコン風も含む）：0.4m/sec*以上、湿度 30%未満の環境下での測定は避けて下さい。
*風速 0.4m/sec の目安は弊社ホームページ http://www.shibayagi.co.jp：ELISA 技術情報をご参照下さい。

６．技術上のヒント

●検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけて下さい。1 ウエル／1 チップのご使用をお薦めします。
●発色液は 96 ウエルプレートに使用するまではほぼ無色または澄明です。光を避けて保存して下さい。
●反応停止液は 96 ウエルプレートに使用するまでは無色です。反応停止液をウエルに入れるとすぐに青から黄色に変わります。
●やむを得ず、測定操作を、風速：0.4m/sec 以上、湿度 30%未満の環境下で実施する場合には、各ステップの静置反応時、プレートカバーをすることに加え、各ウエルの密閉度を上げる措置を講じて下さい。
例）パラフィルムでウエルを覆い、その上にプレートカバーを被せる、またはインキュベータ内、発泡スチロール製箱内で静置反応させる等。測定室の環境条件により対策方法が異なる場合がありますので、詳細を弊社ホームページ http://www.shibayagi.co.jp：ELISA 技術情報でご確認下さい（ご不明な際にはお問い合わせ下さい）。
●使用済みの検体、使用した消耗品等は 1%ホルマリン、2%グルタールアルデヒドまたは 0.1%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 時間以上浸けて下さい。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄して下さい。また、使用した消耗品や未使用の薬品類は所属先施設の規定並びに各地域の法令にしたがって破棄して下さい。

７．構成品

検体前処理用試薬構成品	状　態	容　量
(1)前処理液-1（1M　HCl）	そのまま使用	2ml/1 本
(2)前処理液-2（硫酸アンモニウム溶液）	そのまま使用	10ml/1 本
(3)前処理液-3（エタノール-塩酸溶液）	そのまま使用	28ml/1 本

測定用試薬構成品	状　態	容　量
(A) 抗体固相化 96 ウエルプレート	そのまま使用	96 wells（8×12）/1 枚
(B) 標準インスリン溶液（ネコ）(5 ng/ml)	濃縮液	200µl/1 本
(C) 緩衝液	そのまま使用	60ml/1 本
(D) ビオチン結合抗インスリン抗体	濃縮液	150µl/1 本
(E) ペルオキシダーゼ・アビジン結合物	濃縮液	150µl/1 本
(F) 発色液（TMB）	そのまま使用	12ml/1 本
(H) 反応停止液（1M H_2SO_4）※取扱注意	そのまま使用	12ml/1 本
(Ｉ) 濃縮洗浄液（10x）	濃縮液	100ml/1 本
プレートカバー		1 枚
取扱説明書		1 部

８．添付されていないが必要な器具

●精製水（蒸留水）●標準溶液希釈用試験管●PP または PE 製サンプルチューブ（検体前処理に使用）●洗浄液（希釈用溶液）用ガラス器具（メスシリンダー・瓶）●チップ交換型ピペット（使い捨てチップで 0.5～10µl、10～100µl を正確にピペットできるもの）●連続分注ピペット（例 Eppendorf の multipette plus)、100µl を連続分注できるもの●ペーパータオル等の吸水性のあるもの（洗浄後にプレートに残った液を取り除く）●撹拌器（Vortex タイプ）●遠心分離機●96 ウエルプレート用シェイカー（約 800 rpm）●96 ウエルプレート用洗浄機（あれば好ましい）または噴射ビン（弊社ホームページ http://www.shibayagi.co.jp：用手法による ELISA 操作法をご参照下さい。）●96 ウエルプレートリーダー（450 ±10 nm 、620nm：600～650nm）●データ分析用ソフトウェア（あれば好ましい）

９．試薬の調製

＊キットの試薬はすべて使用前に必ず室温（20～25℃）に戻して下さい。
＊測定に必要な分だけ試薬を調製して下さい。（ご不明な際にはお問い合わせ下さい。）
＊キット外箱のラベルに記載されている有効期限の過ぎた試薬は使用しないで下さい。

●室温化後そのまま使用できる試薬類

［抗体固相化 96 ウエルプレート］

安定性と保存方法

未使用（冷蔵状態を保った状態でシールを剥がしてない。）抗体固相化ストリップは同梱のジップシールのついたパックに戻し、そのまま 2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

［検体前処理用試薬］及び［緩衝液］、［発色液（TMB)］

安定性と保存方法

一部の溶液を使用する際には必要量より少し多めの量を別の容器に移し、残りは室温に戻さないで直ちに蓋をしっかり閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

［反応停止液（1M H_2SO_4)］※取扱注意

安定性と保存方法

使い残りを保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

●濃縮された試薬類

［濃縮洗浄液(10x)］

濃縮洗浄液（10x）を室温化された精製水（蒸留水）で 10 倍に希釈して実用希釈倍率 1x 溶液を調製して下さい。
例：100ml の濃縮洗浄液（10x）＋900ml の精製水（蒸留水）（96 ウエル全てを使用する場合）

安定性と保存方法

濃縮洗浄液（10x）を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

［標準インスリン溶液（ネコ）(5 ng/ml)］；標準曲線作製用

標準インスリン溶液（ネコ）(5 ng/ml)（原液）を使って以下のように標準溶液を準備して下さい。これは一例です。

標準溶液の容量	緩衝液	濃度（pg/ml）	濃度（µIU/ml）
原液 50µl	50µl	2,500	65
2,500 pg/ml 溶液 50µl	50µl	1,250	32.5
1,250 pg/ml 溶液 50µl	50µl	625	16.3
625 pg/ml 溶液 50µl	50µl	313	8.13
313 pg/ml 溶液 50µl	50µl	156	4.06
156 pg/ml 溶液 50µl	50µl	78	2.03
78 pg/ml 溶液 50µl	50µl	39	1.02
0（ブランク）	50µl	0	0

安定性と保存方法

キットを分割して使用する際には使用する直前に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。希釈した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないで下さい。

※μIU/ml 換算は 26IU/mg で行っております（3.イントロダクション参照）。

[ビオチン結合抗インスリン抗体]

150μl を充分分取できる量をご提供しています。**濃縮液を緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。**

安定性と保存方法

キットを分割して使用する際には使用する直前に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

[ペルオキシダーゼ・アビジン結合物]

150μl を充分分取できる量をご提供しています。**濃縮液を緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。**

安定性と保存方法

キットを分割して使用する際には使用する直前に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

１０．検体の調製

本キットはネコ血清または血漿（ヘパリン血漿を推奨します）中のインスリンを測定します。検体は採取後すぐに測定するか、−35℃以下で凍結保存して下さい。凍結した検体は測定する直前に解凍し充分に撹拌して下さい。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。正しい結果が得られない原因になります。また、溶血した検体や高脂質検体は使わないで下さい。妨害物質の影響が疑わしい検体は、同一検体において、異なる 2 ポイント以上の希釈率で希釈直線性を確認して下さい。検体を希釈する場合は、あらかじめ試験管等を用いて緩衝液で希釈し測定ウエルに分注して下さい。濁り及び不溶物のある検体は遠心分離等で除去後測定に用いて下さい。

安定性と保存方法

冷蔵保管するとインスリンが失活しますので、最終濃度が 100～500KIU のアプロチンを添加して保管して下さい。（KIU：kallikrein inhibitor unit）また、長期に保管する場合は、−35℃以下での凍結保管を推奨します。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。

検体前処理方法：下記前処理を行い測定用検体として下さい。

（1） PP または PE 製サンプルチューブにネコ検体（血清／血漿）を 10μl 分取し、前処理液-1 を 1μl 加え直ちに撹拌します。

（2） 次に、前処理液-2 を、各サンプルチューブに 11μl 加え、良く撹拌し室温（20～25℃）で 10 分間静置します。

（3） 撹拌後、さらに各サンプルチューブに前処理液-3 を 52μl 加え良く撹拌し室温で 10 分間静置します。

（4） その後、遠心分離により不溶解物を除き、上清を前処理検体とします。

・遠心分離目安：2,000g×15 分、4℃

・前処理検体は、直ちに測定して下さい。保管する場合は-35℃以下で保管して下さい。

※前処理液-1～3 の添加量は、ネコ血清／血漿量に合わせ、同割合で変動させても構いません。

【前処理操作概要】

ネコ血清（血漿） 10μl
↓
前処理液-1 1μl
↓撹拌
前処理液-2 11μl
↓撹拌、室温（20～25℃）、10 分間静置
前処理液-3 52μl
↓撹拌、室温（20～25℃）、10 分間静置
遠心分離 2000g×15 分、4℃
↓
上清を分取し測定用検体とする

ポジティブ検体による測定検体の適合性テスト

これから測定されようとしている検体が本キットの検体としての条件を満たしているかどうかを調べることは、万一期待された測定結果が出なかった場合の原因究明に役立ちます。

一般的に測定検体は様々です。例えば、採血の際の麻酔の有無、麻酔薬の種類、血漿を採取する場合使用した抗凝固剤、検体が常温、低温で放置されていた間に起きた炭酸ガスの消失と pH の上昇、保存剤として加えられた薬物、保存中に起きた血液成分の濃縮、変性などの要因が測定検体には加わっています。このような要因の為に測定検体が本キットの反応系に影響していないかどうかを、できればアッセイ毎に調べたいものです。

実行方法

まず上記のように標準溶液の系列を作ります。適当に選んだ代表的検体、例えば対象群の検体の一つから 90µl＊を小試験管に採り分けます。（採った検体の番号を記録しておいて下さい。仮に No. C とします。）次に標準曲線の最高濃度の液を 10µl 採って小試験管内の検体に加え、よく撹拌します。こうして作製した標準品入りの検体をポジコンとして他の検体と共に測定します。この測定値を検体 No. C の測定結果と比べて見て下さい。もしも、No. C の測定値が A ng/ml であったとしますと標準品入り検体の測定値は測定精度の範囲内で、A x 0.9＋（最高標準溶液濃度 x 0.1）ng/ml になっている筈です。要するに簡単な添加回収試験をやっている訳です。測定検体がこの条件を満足していれば、本キットの測定系が検体に対して満足に機能していることが証明される訳です。

＊90µl がピペットの都合で採取できない場合は 100µl 取っても結構です。それに標準液 10µl を加えた場合、期待測定値は、A x 0.91＋（最高標準溶液濃度 x 0.09）になる筈です。検体が少なくて 90µl は無理だという場合には、(50µl＋5µl）の組み合わせでも良いでしょう。もっと少量の組み合わせではピペットの精度の問題があって測定値の信頼性が疑問になりますし、標準液の量を増やすと検体の希釈が無視できなくなるでしょう。

１１．測定操作法

「抗体固相化プレートのシールは、プレートが充分に室温に戻ってから剥がして下さい。」

（１） あらかじめ調製した洗浄液を各ウエルに満たし 4 回洗浄*します。その後ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。

（２） 各ウエルにビオチン結合抗インスリン抗体を **100µl** ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌**します。

（３） 検体測定ウエルに前処理検体を **10µl** 添加します。

（４） 標準品測定ウエルに各濃度の標準溶液を **10µl** ずつ分注します。

（５） マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌**します。

（６） プレートカバーを被せ、室温（20～25℃）で **2 時間静置**します。

（７） 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし 4 回洗浄*します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。

（８） 各ウエルに、ペルオキシダーゼ・アビジン結合物を **100µl** ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌します。

（９） プレートカバーを被せ、室温（20～25℃）で **30 分間静置**します。

（１０）反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし 4 回洗浄*します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。

（１１）各ウエルに、発色液を **100µl** ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌**します。

（１２）プレートカバーを被せ、室温（20～25℃）で **30 分間静置**します。

（１３）各ウエルに反応停止液を **100µl** ずつ分注し、発色反応を停止します。

（１４）撹拌**後マイクロプレート用分光光度計で 450nm（副波長 620nm）での吸光度を測定します。
副波長は 600～650nm の範囲で使用できます。

注意

＊手動洗浄についての詳細は弊社ホームページの「操作法の一例　用手法」並びに「シバヤギ ELISA キット操作法のてほどき」（Power point）をご参照下さい。
洗浄液の液量目安は 300µl/ウエルです。最小標準溶液濃度（39 pg/ml）の OD 値よりブランク OD 値が高くなる場合があります。その場合は解決方法の 1 つとして、ペルオキシダーゼ・アビジン結合物と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5～8 回に増やして下さい。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安：5～25ml/分（ノズルの径により異なります）洗浄液排出後の乾燥にご注意下さい。

＊＊撹拌の目安：800rpm-10 秒間×3 回

１２．計算

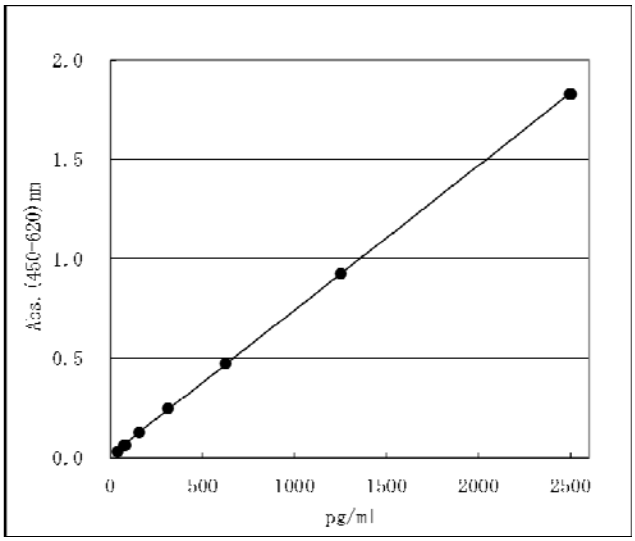
（１）測定毎に標準曲線を作製します。X 軸を標準溶液濃度（pg/ml）、Y 軸を吸光度の標準曲線グラフを作製して下さい。
（標準曲線についての詳細は弊社ホームページのシバヤギ技術情報 ELISA の標準曲線をご参照下さい。弊社では Excel による ELISA 計算法のテンプレートも提供しております。）

（２）標準曲線より、検体の吸光度に対応する濃度（pg/ml）を読み取ります。

（３）**読み取った濃度に、前処理操作で希釈された倍率、<u>7.4 倍</u>を乗じ、検体のインスリン濃度とします。検体をさらに希釈している場合はその希釈倍率も乗じて下さい。**

＊検体の吸光度が標準曲線吸光度より外れた場合は緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定を実施して下さい。

＊コンピュータソフトでの演算処理では、3 次多



項式または 4 パラメーターの使用をお薦め致します。
＊ネコの臨床所見は臨床症状や他の検査結果などを総合的に判断して行う事が必要です。
※グラフは標準曲線の一例です。吸光度は、測定環境により変動します。
※プレートリーダーは SAFIRE Ⅱ(TECAN)を使用

１３．キットの性能

●測定範囲
ネコインスリンを 39～2,500 pg/ml（実効測定範囲は 288.6～18,500pg/ml）の範囲で測定できます。
●特異性
この ELISA 系で使用されている抗体はインスリンに対して特異的です。
●精度試験
（1）アッセイ内変動（5 重測定、3 検体）　　平均 C.V.値は 5%未満
（2）日差再現性試験（3 重測定、3 検体、4 日間）　　平均 C.V.値は 5%未満
●添加回収試験
2 血清検体に異なる 4 濃度のインスリンを添加し測定した結果、回収率は 93.9%から 102%でした。
●希釈直線性
3 血清検体を連続的に希釈用緩衝液で 3 段階希釈し測定した結果、直線回帰の R^2 は 0.9991 から 0.9998 でした。

１４．トラブルシューティングと Q&A

●すべてのウエルでの反応が弱い
可能な解釈
1）標準品や検体の入れ忘れ。
2）発色に関連する試薬溶液の入れ忘れ。
3）発色に関連する試薬溶液の取り違えや希釈調製不良。
4）酵素阻害剤の混入。
5）キット保管温度の影響（凍結した場合）。
6）プレートの過剰な洗浄。
7）発色液の温度が低かった。
●最小標準溶液濃度（39 pg/ml）の OD 値よりブランク OD 値が高くなる
可能な解釈
洗浄が不適当、不完全であった。
（ペルオキシダーゼ・アビジン結合物と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5～8 回に増やして下さい。）
●変動係数（CV）が大きい
可能な解釈
1）洗浄が不適当、不完全であった。
2）標準品や管理血清、または検体の撹拌が不充分であった（凍結検体の撹拌は充分に行って下さい）。
3）ピペッティング操作が一定ではなかった。
●Q-1　：キットは分割して使用することができますか？
A-1　：できます。プレートに貼られた透明シールをストリップの間にそってカッターなどで切り離してご使用下さい。使用しないプレートはシールを貼った状態で冷蔵庫に保管して下さい。
●Q-2　：プレートを取り出したらウエルの中に液体が入っていましたが何ですか？
A-2　：出荷時には保存安定液が充填してあります。
●Q-3　：低濃度のネコインスリンを測定したいのですが、検体の増量は出来ますか？
A-3　：弊社までお問い合わせ下さい。
●更に詳しいトラブルシューティングや Q&A は弊社ホームページをご覧下さい。

１５．参考文献

(1)Presence of anti-insulin natural autoantibodies in healthy cats and its interference with immunoassay for serum insulin concentrations
N.Nishii,M.Takasu,M.Kojima,et al
Domestic Animal Endocrinology 38,138-145(2010)
(2)ネコ血中インスリン濃度の測定とインスリン自己抗体
小島正章、木暮恵美
The Japanese Journal of Prophylactic Veterinary Medicine Vol.1,No.2,69-75(2009)

測定操作概要

＊必ず取扱説明書を一読され詳細について確認後測定操作を行って下さい。

□ウエルプレート、試薬類を充分に室温に戻して下さい。

□濃縮洗浄液の希釈　：室温化された精製水で、10 倍に希釈して下さい。

□標準溶液の希釈(例)：室温化された緩衝液で、希釈して下さい。

濃度(pg/ml)		2,500	1,250	625	313	156	78	39	0
標準溶液(μl)	**原液:**	**50**	50*	50*	50*	50*	50*	50*	0
緩衝液(μl)		50	50	50	50	50	50	50	50

註）＊ひとつ高濃度の標準溶液

□ポジティブ検体の作製

□ビオチン結合抗インスリン抗体：室温化された緩衝液で、100 倍に希釈して下さい。

□	**抗体固相化 96 ウエルプレート**	
□	↓洗浄 4 回＊	
□	**ビオチン結合抗インスリン抗体**	**100μl**
□	↓撹拌＊＊	
□	**検体測定ウエルには前処理検体**	**10μl**
	標準品測定ウエルには標準インスリン溶液	**10μl**
□	↓撹拌＊＊、室温、2 時間反応（静置***）	
□	ペルオキシダーゼ・アビジン結合物の希釈 室温化された緩衝液で、100 倍に希釈して下さい。	
□	↓洗浄 4 回＊	
□	**ペルオキシダーゼ・アビジン結合物**	**100μl**
□	↓撹拌＊＊、室温、30 分間反応（静置***）	
□	↓洗浄 4 回＊	
□	**発色液　（TMB ）**	**100μl**
□	↓撹拌＊＊、室温、30 分間反応（静置***）	
□	**反応停止液　（1Ｍ　H_2SO_4）**※取扱注意	**100μl**
□	↓撹拌＊＊	
□	**吸光度測定（主波長 450nm、副波長　620nm）**	

室温：20～25℃

＊プレート洗浄機またはピペットで洗浄液を加える場合の液量目安：300μl/ウエル
プレート洗浄機圧力目安：5～25ml/分（ノズルの径により異なります）
洗浄液排出後の乾燥にご注意下さい。

＊＊撹拌の目安：800rpm-10 秒間×3 回

＊＊＊撹拌終了後 96 ウエルプレートの上にプレートカバーを被せて静置して下さい。
副波長は 600～650nm の範囲で設定して下さい。

ワークシート

例）

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	**2,500 pg/ml**	ポジコン	検体 8	検体 16	検体 24	検体 32
B	**1,250 pg/ml**	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
C	**625 pg/ml**	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
D	**313 pg/ml**	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
E	**156 pg/ml**	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
F	**78 pg/ml**	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
G	**39 pg/ml**	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
H	**0**	検体 7	検体 15	検体 23	検体 31	検体 39

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	１０	１１	１２
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

【貯法】　　；2～8℃、暗所（凍結厳禁）

【有効期限】　；製造日から 6 ヶ月間（使用期限は外箱上蓋のラベル内に表示）

【英語表記】　；Cat Insulin ELISA KIT(AKRIN-015,Shibayagi,Gunma,Japan)

【お問い合せ先】

製造／発売元；株式会社　シバヤギ

〒377-0007　群馬県渋川市石原 1062-1

TEL.0279-25-0279　　FAX.0279-23-0313

<E-mail>syc-info@shibayagi.co.jp

<URL>http://www.shibayagi.co.jp